

骨髓移植後の免疫学的検討 (I)

Tリンパ球サブセットとその免疫学的反応性について

金沢大学医学部第三内科学教室 (主任: 服部絢一教授)

上 田 幹 夫

(昭和59年1月19日受付)

同種骨髓移植および自家骨髓移植後長期生存している患者を対象として、末梢血 T-cell サブセットおよびその免疫学的反応性について比較検討を行った。同種移植 (4例) および自家移植 (4例) の両群は、移植前の基礎疾患、移植前処置としての治療、移植後の支持療法、移植から免疫学的検討を加えるまでの期間、などの点でほとんど差異を認めず、群間比較が検討可能な対象と思われた。これら両群の間の比較では、モノクローナル抗体の OKT 3, OKT 4, OKT 8 および OKTa 1 陽性細胞数に有意な差を認めた。さらに移植患者と正常人との間にも同様な T-cell サブセットの明らかな差異を認めた。特徴的なことは、移植後長期にわたって回復遅延傾向を示す OKT 4 陽性細胞と、著明な増加傾向を示す OKT 8 陽性細胞が常に観察される点で、このため OKT 4/OKT 8 比は両移植群とも著明な低値が持続し、この OKT 4/OKT 8 比は自家移植群に比べ同種移植群で有意に低下していた。mitogen に対する幼若化反応 (以下 mitogen 反応性とする。) も T-cell サブセットと同様に、同種移植群が自家移植群に比し著明な低反応性を示し、また移植患者の反応性は正常人に比べ明らかな低下を示した。一方、リンパ球混合培養 (mixed lymphocyte culture, 以下 MLC と略) を用いた同種抗原に対する反応性 (MLC 反応性) に関する検討では、移植患者および正常人の間に差異は認められず、また同種移植群と自家移植群の比較でも MLC 反応性に有意差はみられなかった。つぎに、mitogen 反応性と T-cell サブセットとの関係を検討すると、phytohemagglutinin (PHA) 反応性のみが OKT 4/OKT 8 比および OKT 4 陽性細胞数と有意 (いずれも $p < 0.01$) の相関を示した。以上の成績より、骨髓移植後長期生存している例でも、T-cell の再構築は不完全でかつ異常が認められ、その異常は T-cell サブセットのインバランスを特徴とし、同種移植および自家移植の両群に認められるが、前者にその程度がより深いことが示唆された。

Key words Bone marrow transplantation, T-cell reconstitution, Proliferative response

白血病や再生不良性貧血などに対する治療法として、同種骨髓移植 (allogeneic bone marrow transplantation, 以下 allo-BMT と略) は目覚ましい進歩を遂げている。しかしながら、allo-BMT 患者はしばしば acute graft-versus-host disease (以下 aGVHD と略), chronic graft-versus-host disease (以下 cGVHD と略) および長期にわたり持続する免疫不全によるものと考えられる日和見感染などの危険にさらされ、これが死因の大部分を占めている¹⁾。これら

GVHD や免疫不全状態にみられる免疫学的問題は、主に T-cell の再構築およびその機能を検討することに重点が置かれてきた²⁾³⁾。また、骨髓移植後の免疫学的回復に関する検討は、allo-BMT 患者については多数の報告⁴⁾⁻⁸⁾がみられるが、自家骨髓移植 (autologous bone marrow transplantation, 以下 auto-BMT と略) 患者についての検討⁹⁾はきわめて少ない。当教室塩原¹⁰⁾は、骨髓移植後早期の免疫学的再構築について、auto-BMT 群の方が allo-BMT 群に比べ再構築が早

Studies on Immunological Reconstitution after Bone Marrow Transplantation. [I] : Recovery of T-cell Subsets and Immune Reactivities. Mikio Ueda, Department of Internal Medicine III (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920.

くしかも完全であることを報告している。また原田ら¹¹⁾も、移植後末梢血リンパ球の回復初期において、allo-BMT では見られない T-cell の急峻なスパイクを auto-BMT の大多数例で認める報告をしており、allo-BMT, auto-BMT ではリンパ組織系の再構築に相違がある可能性を示唆している。そこで、本研究では骨髄移植後 1 年以上長期生存している症例を対象として、allo-BMT と auto-BMT において移植後の免疫学的回復に差があるかどうかを明らかにするために、末梢血サブセットおよび種々の抗原刺激に対するリンパ球増殖反応につき検討を加えた。

対象および方法

I. 骨髄移植の方法

当教室における allo-BMT および auto-BMT の方法について、既に詳細に報告¹²⁾¹³⁾されているのでここではその既略を述べる。Fig. 1 に示されるように allo-および auto-BMT 患者は、移植前処置として大量 (120 mg/kg) のサイクロホスファミド (cyclophosphamide) と 10 Gy の total body irradiation (TBI) を受けるため、移植後ほぼ完全な骨髄無形成が招来され、この造血不全状態を回復させる目的で allo-あるいは auto-BMT が施行されている。allo-BMT は Fig. 1(a) に示されるように、HLA の一致している同胞から採取した骨髄細胞を、auto-BMT は Fig.

1(b) に示されるように、腫瘍細胞浸潤を認めない時期に採取凍結保存した自家骨髄細胞を解凍し輸注する。移植前処置から移植骨髄が生着しその機能が回復するまでの間は、laminar air flow を備えた無菌室に隔離し、非吸収性抗生剤の内服吸入により腸管内菌叢の完全抑制を行い、中心静脈高カロリー栄養を含む強力な支持療法を施行した。allo-BMT 患者には、GVHD の予防のため Thomas らの標準的な方法¹⁵⁾によってメソトレキセート (methotrexate) を移植後 day 102 まで投与した。

II. 対象患者

Table 1 は本研究の対象とした症例の臨床的特徴を示したものである。allo-BMT を受けた 4 例は、2 例が acute lymphoblastic leukemia (ALL)、残り 2 例が acute myelogenous leukemia (AML) の基礎疾患を有していた。年齢は 13 歳から 46 歳までで、平均年齢は 26 歳であった。4 例とも現在無治療で生存中であるが、cGVHD が消褪し後遺症を残している 1 例 (No. 1) を除き、残る 3 例は cGVHD を全く認めなかった。auto-BMT を受けた 4 例は、3 例が advanced non-Hodgkin's lymphoma (NHL)、1 例が比較的早期の nasopharyngeal carcinoma (NPC) の基礎疾患を有していた。患者の年齢は 28 歳から 52 歳に及び、平均年齢は 39 歳であった。移植後 6 カ月目以後に発症した感染症については、ウイルス感染症と真菌感染症

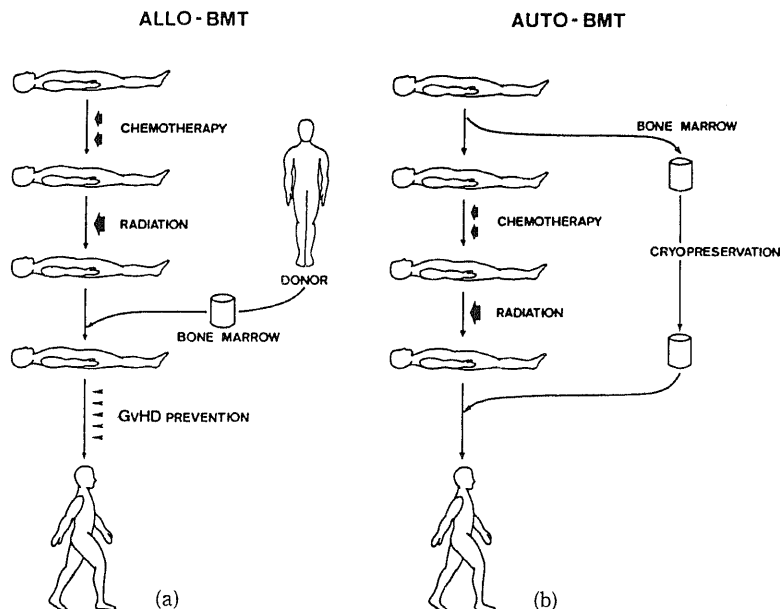


Fig. 1. Schematic representations of allogeneic and autologous bone marrow transplantation (allo-BMT and auto-BMT).

を認め、allo-BMT 群では4回、auto-BMT 群では1回の発症を認めた。免疫学的検査を実施した時に、No. 3とNo. 4の2例に漸減量である少量のプレドロソロン(prednisolone)が投与されていた他には、免疫抑制剤は使用されていなかった。なお、対照に用いた正常人は、患者の年齢に相応する年齢層の健康人を選択した。

III. 末梢血単核細胞の分離

末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cells, 以下PBMCと略)は、ヘパリン加末梢血からFicoll-Hypaque比重遠心法を用いて分離した。PBMCはRPMI 1640培養液(GIBCO, Grand Island, N. Y.)で3回洗浄し、15% fetal calf serum(以下FCSと略, GIBCO)加RPMI 1640培養液に再浮遊させ、以下の実験に用いた。なお、Table 1に示すように、4人ずつのallo-BMTおよびauto-BMT患者からそれぞれ8回と7回の検体採取を行った。

IV. モノクローナル抗体を用いたT-cellサブセットの解析

T-cellの分化抗原に対する特異的なモノクローナル抗体OKT 3, OKT 4, OKT 8およびOKIal(Ortho Diagnostic Systems Inc. Raritan, U. S. A.)を用いて、移植患者PBMCにおけるT-cellサブセットを間接蛍光抗体法で検討した。200 μ lの培養液に浮遊させ

た 1×10^6 のPBMCに対し、各モノクローナル抗体を5 μ lずつ加え4°Cで30分反応させた。反応終了後、cold phosphate buffer saline(以下cold PBSと略, 日水製薬)を用い、2回洗浄した後、100 μ lのcold PBSに再浮遊させ、そこへ、40倍に希釈した蛍光標識抗マウスIgGヤギ血清(Cappel Lab. Cochranville, U. S. A.)を等量加え4°Cで30分間反応させた。反応終了後、cold PBSを用い3回洗浄した後pelletを再浮遊させ、蛍光顕微鏡(Fluophot, Nikon, Tokyo)下で陽性細胞を算定した。算定は400個の細胞を観察し、その陽性細胞の比率を求め、これとPBMC数との積により各T-cellサブセットの実数を算出した。

V. mitogen反応性とリンパ球混合培養

mitogen反応性およびリンパ球混合培養(Mixed lymphocyte culture, 以下MLCと略)は既に報告した方法⁽⁴⁾に拠って行った。すなわち、mitogen反応は、PBMCを 1×10^6 /ml濃度で15%FCS加RPMI 1640培養液に浮遊させたものを、200 μ lずつmicroplate(Nuncclon # 163320, Nunc, Denmark)に分注し、あらかじめ予備実験で得られたそれぞれのmitogenの至適量を加え72時間培養した。mitogenとしては、concanavarin A(以下Con Aと略, Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany) Phytohemagglutinin-P(以下PHAと略, Difco Lab, U. S. A.)

Table 1. Patient characteristics

Patient No.	Age	Sex	Diagnosis ^a (stage at BMT)	GVHD ^b Acute chronic		Infection ^c in long term period	Outcome ^d survival(mo)	Sampling date(mo)
Allogeneic								
1	27	M	ALL (1st Rel)	II	inactive	Trichophyton	CR (> 64)	43, 52
2	18	M	ALL (1st CR)	(-)	(-)	VZV	CR (> 29)	14, 23
3	46	M	AML (1st CR)	(-)	(-)	VZV Trichophyton	CR (> 18)	12, 15
4	13	F	AML (2nd CR)	II	(-)	(-)	CR (> 15)	12, 15
Autologous								
5	38	M	NHL (III)	-	-	(-)	CR (> 39)	24, 30
6	28	M	NPC (T ₁ N ₂ M ₀)	-	-	(-)	CR (> 39)	24
7	52	M	NHL (III)	-	-	VZV	CR (> 37)	22, 27, 31
8	38	F	NHL (III)	-	-	(-)	CR (> 29)	23

^a ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myelogenous leukemia; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; NPC, nasopharyngeal carcinoma; Rel, relapse; CR, complete remission; BMT, bone marrow transplantation

^b GVHD, graft-versus-host disease.

^c VZV, varicella zoster virus.

^d mo, month.

および pokeweed mitogen (以下 PWM と略), GIBCO) の 3 種類を使用した. MLC は PBMC 1×10^5 を responder cells とし, 2000 rad X 線照射した非血縁者の PBMC 1×10^5 を stimulator cells として, 両者を microplate (Nunc # 163320) を用い 200 μ l の 15% FCS 加 RPMI 1640 培養液中で 7 日間混合培養し

た. mitogen 反応性および MLC は全て triplicate で行い, 培養は 37°C, 100% 湿度, 5% CO₂ in air の条件下で行った. 各種 mitogen および同種抗原に対するリンパ球増殖反応は ³H-thymidine (以下 ³H-TdR と略, New England Nuclear, specific activity 5ci/mM) の取り込みにより測定した. すなわち, 培養終了

Table 2. Evaluation of optimal doses of concanavarin A, phytohemagglutinin and pokeweed mitogen for mitogenic responses.

Mitogen	Dose	³ H-TdR uptake (cpm)
Con A ^a (n=6)	1.25 μ g/well	61,064 \pm 4,439
	2.50 "	* 72,980 \pm 13,332
	5.00 "	47,012 \pm 19,017
	10.00 "	18,056 \pm 14,695
PHA ^b (n=4)	0.25 μ l/well	103,713 \pm 16,426
	0.50 "	127,379 \pm 25,542
	1.00 "	* 139,101 \pm 32,798
	2.00 "	120,307 \pm 47,532
PWM ^c (n=4)	1.25 μ l/well	24,095 \pm 6,858
	2.50 "	31,096 \pm 10,481
	5.00 "	* 33,283 \pm 9,767
	10.00 "	29,803 \pm 8,021

^a concanavarin A, ^b phytohemagglutinin, ^c pokeweed mitogen. Each value represents the mean \pm 1 standard deviation. 2×10^5 peripheral blood mononuclear cells in 200 μ l of medium were cultured with various doses of each mitogen. After 72 hr cultures, cells were harvested and ³H-thymidine (³H-TdR) uptake was measured.

Table 3. T-cell subsets in long-term survivors and normal controls.

T-cell subsets	Total Numbers (/mm ³)		
	Allogeneic (n=8)	Autologous (n=7)	Control (n=8)
PBL ^a	4,516 \pm 844	1,947 \pm 623	2,533 \pm 659
OKT 3	3,299 \pm 1,203	1,235 \pm 356	1,466 \pm 376
OKT 4	998 \pm 185	571 \pm 184	929 \pm 235
OKT 8	2,560 \pm 799	829 \pm 267	567 \pm 147
OKIa1	691 \pm 412	318 \pm 95	317 \pm 82
OKT 4/OKT 8	0.43 \pm 0.17	0.74 \pm 0.33	1.57 \pm 0.44

^a PBL, peripheral blood lymphocyte.

^b *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05. Each value represents the mean \pm 1 standard deviation.

10~12時間前に $1\mu\text{Ci}/5\mu\text{l}$ の ^3H -TdRを各Wellに加え、automatic multiple cell harvester (ラボマッシュLM-101, ラボサイエンス)により培養細胞を回収した後、液体シンチレーションカウンター(LSC-651, Aloka)で放射活性を測定し、測定された ^3H -TdR摂取量をcpmで表わした。

成績

I. mitogen の至適量

Table 2 は種々の濃度の Con A, PHA および PWM を添加した場合の、それぞれの mitogen 反応性を cpm で示したものである。この表からも明らかなように、Con A, PHA および PWM の至適量はそれぞれ $2.5\mu\text{g}/\text{well}$, $1\mu\text{l}/\text{well}$, $5\mu\text{l}/\text{well}$ であった。したがって、以下の実験ではこの至適量で刺激した場合の mitogen 反応性を検討した。

II. T-cell サブセット

Table 3 は、末梢血におけるリンパ球、各 T-cell サブセットの絶対数および OKT 4 陽性細胞と OKT 8 陽性細胞の比 (以下 OKT 4/OKT 8 比と略) を示したものである。末梢血リンパ球数は、allo-BMT 群で $4,516\pm 844/\text{mm}^3$, auto-BMT 群で $1,947\pm 623/\text{mm}^3$ と、auto-BMT 群に比較して allo-BMT 群で有意 ($p<0.001$) の増加を認めたが、auto-BMT 群は正常対照群 $2,533\pm 659/\text{mm}^3$ と有意差を認めなかった。OKT 3 陽性細胞数は、それぞれ $3,299\pm 1,203/\text{mm}^3$ と $1,235\pm 356/\text{mm}^3$ と、allo-BMT 群で有意 ($p<0.001$) の増加を認めたが、これも auto-BMT 群は正常対照群 $1,466\pm 376/\text{mm}^3$ と有意差を認めなかった。OKT 4 陽性細胞数は、それぞれ $998\pm 185/\text{mm}^3$ と $571\pm 184/$

mm^3 と allo-BMT 群が正常対照群 $929\pm 235/\text{mm}^3$ と有意差を認めないのに対し、auto-BMT 群で正常対照群より有意 ($p<0.05$) の低下を示した。OKT 8 陽性細胞数は、それぞれ $2,560\pm 799/\text{mm}^3$ と $829\pm 267/\text{mm}^3$ と allo-BMT 群では有意 ($p<0.001$) の増加を認めたが、auto-BMT 群では正常対照群 $567\pm 147/\text{mm}^3$ と有意差は認めなかった。OKIa 1 陽性細胞数は、それぞれ $691\pm 412/\text{mm}^3$ と $318\pm 95/\text{mm}^3$ と、allo-BMT 群に有意 ($p<0.05$) の増加を認めたが、auto-BMT 群では正常対照群 $317\pm 82/\text{mm}^3$ と有意差を認めなかった。OKT 4/OKT 8 比は、allo-BMT 群 0.43 ± 0.17 および auto-BMT 群 0.74 ± 0.33 と、allo-BMT 群で有意 ($p<0.05$) の低下を認め、さらに、auto-BMT 群は正常対照群 1.57 ± 0.44 に比較し有意 ($p<0.01$) の低下を認めた。以上の成績を要約すると、allo-BMT 群では、OKT 3 陽性、OKT 8 陽性リンパ球および OKIa 1 陽性細胞が有意に増加し、そのため OKT 4/OKT 8 比は 1 以下となりいわゆる OKT 4/OKT 8 比の逆転が著明であったのに対し、auto-BMT 群では OKT 3, OKT 8 および OKIa 1 陽性細胞数は正常であったが OKT 4 陽性細胞のみが有意な低下を示し、そのために allo-BMT 群程顕著ではないものの、やはり OKT 4/OKT 8 比の逆転が auto-BMT 群でも認められたといえる。なお、この OKT 4/OKT 8 比の逆転は、allo-BMT 後 5 年以上経過している例 (No.1) にも認められている。

III. mitogen 反応性とリンパ球混合培養

Table 4 は Con A, PHA および PWM 刺激による mitogen 反応性と, alloantigen 刺激により MLC 反応性を示したものである。まず、Con A 反応性について

Table 4. Proliferative responses in long-term survivors and normal controls

Mitogen	^3H -TdR uptake (cpm)		
	Allogeneic (n=8)	Autologous (n=7)	Control (n=8)
Con A ^a	$13,379\pm 7,624$	$27,470\pm 14,977$	$78,935\pm 16,976$
PHA ^b	$33,680\pm 12,156$	$61,225\pm 12,602$	$117,527\pm 33,632$
PWM ^c	$8,536\pm 4,951$	$42,374\pm 33,434$	$47,681\pm 16,710$
MLC ^d	$40,386\pm 16,771$	$30,090\pm 12,724$	$44,055\pm 18,611$

^a Con A, concanavarin A; ^b PHA, phytohemagglutinin;

^c PWM, pokeweed mitogen; ^d MLC, mixed lymphocyte culture

*** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$.

Each value represents the mean ± 1 standard deviation.

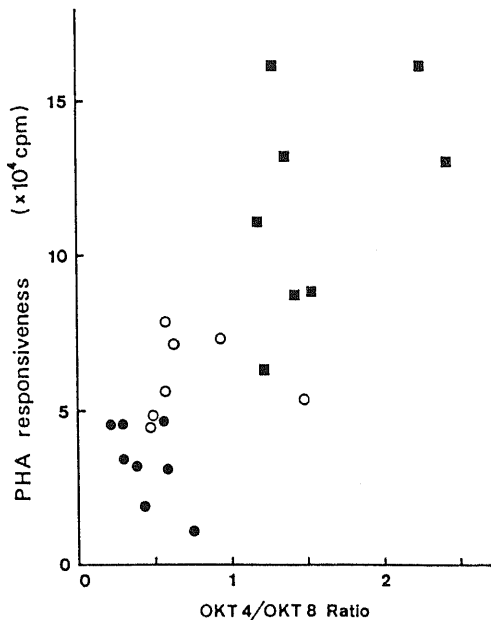


Fig. 2. Correlation between PHA responsiveness and the OKT4/OKT8 ratios in allotransplants (●), autotransplants (○) and normal controls (■). A significant correlation ($r=0.77$, $p<0.01$) was observed between them.

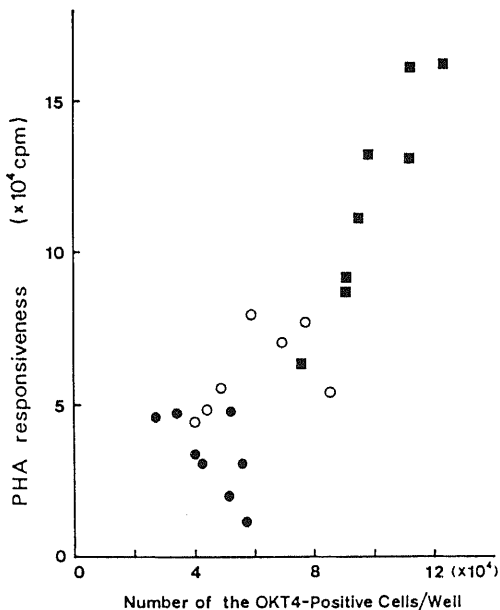


Fig. 3. Correlation between PHA responsiveness and the absolute number of the OKT4-positive cells per well in allotransplants (●), autotransplants (○) and normal controls (■). A significant correlation ($r=0.75$, $p<0.01$) was observed between them.

は, allo-BMT 群は $13,379 \pm 7,624$ cpm と auto-BMT 群 $27,470 \pm 14,977$ cpm に比べて, 有意 ($p<0.05$) の低反応性を示し, auto-BMT 群も正常対照群 $78,935 \pm 16,976$ cpm に比べ有意 ($p<0.01$) の低下を認めた. PHA 反応性は, allo-BMT 群では $33,680 \pm 12,156$ cpm, auto-BMT 群では $61,225 \pm 12,602$ cpm, 正常対照群では $117,527 \pm 33,632$ cpm と 3 群間それぞれの間に有意差 ($p<0.01$) を認めた. PWM 反応性は, allo-BMT 群では $8,536 \pm 4,951$ cpm, auto-BMT 群では $42,374 \pm 33,434$ cpm, 正常対照群では $47,681 \pm 16,710$ cpm と allo-BMT 群と auto-BMT 群との間に有意 ($p<0.05$) の差を認めたが, auto-BMT 群と正常対照群との間では明らかな差は認めなかった. MLC 反応性は, allo-BMT 群では $40,386 \pm 16,771$ cpm, auto-BMT 群では $30,090 \pm 12,724$ cpm, 正常対照群では $44,055 \pm 18,611$ cpm と 3 群間で有意の差は認めなかった. 以上の成績を要約すると, いずれの mitogen 反応性においても allo-BMT 群は auto-BMT 群に比べ有意の反応性低下を認め, また auto-BMT 群も Con A および PHA 反応性において正常対照群より有意の低下を認めるが, MLC 反応性ではこれら 3 群間にほとんど差異を認めないということができる.

IV. T-cell サブセットと mitogen 反応性および MLC 反応性との関係

つぎに, T-cell サブセットの増減がリンパ球の mitogen 反応性や MLC 反応性と何らかの関連を有するかについて検討を行った. まず, OKT 4 陽性細胞, OKT 8 陽性細胞および OKT 4/OKT 8 比と, allo-BMT 患者, auto-BMT 患者および正常人における mitogen 反応性との関係を検討した. その結果は, Fig. 2 に示すように, PHA 反応性は OKT 4/OKT 8 比と有意 ($p<0.01$) の相関を示すことが明らかとなり, さらに, Fig. 3 に示すように, OKT 4 陽性細胞数とも有意の相関 ($p<0.01$) を示した. しかし, PHA 反応性は OKT 8 陽性細胞数とは有意の相関を示さなかった. 図には示していないが, Con A 反応性も OKT 4/OKT 8 比と相関を示したが有意な相関とは言えず, OKT 4 陽性細胞, OKT 8 陽性細胞数との相関も認められなかった. 一方, PWM 反応性および MLC 反応性と T-cell サブセットおよび OKT 4/OKT 8 比との間には全く相関関係がみられなかった.

考 察

骨髓移植後の造血回復はきわめてすみやかであり, 同種移植でも自家移植でも移植後 2~3 カ月ではほぼ完全な血液学的再構築がほとんどの症例で観察される.

これに比べ、移植後の免疫学的再構築は非常に遅延し、移植後1年以上経過した患者においても、かなり高度の免疫不全状態が存在していることが本研究で明らかとなった。さらに、検討した長期生存例の症例数は少ないが、T-cell サブセットの回復、mitogen 反応性の回復と比較する限り、auto-BMT 群より allo-BMT 群における回復遅延が著明で、しかもその回復の程度がきわめて低いことが特徴として注目される。このことは、骨髓移植後早期の免疫学的回復は auto-BMT 例より allo-BMT 例の方がより遅く不完全であるという塩原ら¹⁰⁾の報告と矛盾しない所見である。Fass ら¹⁹⁾は5カ月以上生存している3例の auto-BMT 患者を対象にし、抗体産生能やリンパ球増殖反応を調べ、allo-BMT 患者より回復が完全であることを報告しており、また Fay ら¹⁰⁾も、9カ月以上生存した1例の同系骨髓移植 (syngeneic BMT) 患者と、6カ月以上生存した2例の auto-BMT 患者を対象として免疫グロブリン産生能を検討し、auto-又は syngeneic BMT 群の方にその早い回復を認めている。これらの報告は、免疫学的検討の時期や方法はかなり異なるものの本研究の成績と矛盾しない報告と考えられるが、一方では、同種、自家および同系骨髓移植において移植後の免疫学的再構築に差が認められないとする報告^{6)17)~20)}も少なからず見られる。これらの報告⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾が対象としている auto-BMT 患者および syngeneic BMT 患者の数は1人又は2人と非常に少なく、しかも検討に用いた患者の移植後の時期に関しては、早期例と長期生存例では10倍近くの時間の差異がありさらに移植前処置にも違いがあるなど、多数の allo-BMT 患者の回復と直接比較することは適当でないと思われる。骨髓移植後の免疫学的回復に影響を及ぼす因子として移植前処置、移植後の免疫学的検索時期および GVHD の有無が重要と考えられ、allo-BMT と auto-BMT との比較を行う場合には、先に述べた影響因子などを考慮して、できるだけ同じ条件下で比較検討する必要があると考えられる。

allo-BMT 患者における T-cell サブセットに関する多くの報告^{4)~9)}では、OKT 4/OKT 8 比の逆転が共通した所見として指摘されている。この OKT 4/OKT 8 比の逆転は、表面抗原から認識される helper T-cell の phenotype と suppressor T-cell の phenotype を有する細胞集団の不均衡、つまり OKT 4 陽性細胞の減少および OKT 8 陽性細胞の増加を反映している。これらの報告にみられる OKT 4/OKT 8 比の逆転が、本研究の対象とした auto-BMT 患者の全例に認められた点は興味深い。最近、Linch ら⁹⁾は allo-BMT および auto-BMT 後早期の T-cell サブセッ

トをモノクローナル抗体を用いて検討し、同様の成績を報告している。その成績によれば、骨髓移植後1年に満たない患者では、auto-BMT 群と allo-BMT 群とでは、T-cell サブセットの再構築に差は認められていない。われわれの数少ない症例における検討でも、移植後3カ月頃までは T-cell サブセットは両移植群で明らかな差を認めていない。しかしながら、OKT 4/OKT 8 比の低下は骨髓移植患者だけでなく他のかなりの疾患でもみられる所見であるが、移植後早期より観察され、しかも移植後1年以上経過しても継続して認められることはかなり特異なことと思われる。この OKT 4/OKT 8 比の逆転の原因は、現在までのところ十分明らかにされていないが、可能性として考えられることは、骨髓移植の種類に関係なく、OKT 8 という細胞表面抗原を有する細胞が、OKT 4 陽性細胞に比べその前駆細胞から容易に分化できる、あるいは分化を容易にする免疫学的環境が骨髓移植という治療法によりもたらされるのかもしれない。このことと直接の関連はないが、Janossy ら²¹⁾は正常人の骨髓 T-cell についてそのサブセットを検討し、同程度の OKT 4/OKT 8 比の逆転を報告している。著者が調べた範囲でも、正常人骨髓 T-cell の OKT 4/OKT 8 比が逆転していることを確めており、移植後の OKT 4/OKT 8 比の逆転と何らかの関連を有するか興味を持たれるところである。

つぎに、移植患者リンパ球の mitogen 刺激や同種抗原刺激に対する増殖反応を検討した成績では、MLC 反応性を除き、どの mitogen 反応とも移植患者の方が正常人より明らかに低下していた。さらに、この移植患者の mitogen 反応性低下は、auto-BMT 群に比較し allo-BMT 群でより顕著であった。このような抗原刺激に対する低反応性が先に述べた T-cell サブセットの異常とどのような関連を有するかについては、一定の傾向はみられなかった。しかし mitogen 反応性を OKT 4/OKT 8 比、OKT 4 陽性細胞数および OKT 8 陽性細胞数と対比検討したところ、PHA 反応性は OKT 4/OKT 8 比および OKT 4 陽性細胞数と強い有意の相関を示した。Reinherz ら²²⁾によれば、PHA 刺激に反応する T-cell サブセットは OKT 4 陽性細胞とされているので、PHA 反応性は PHA 刺激に反応する OKT 4 陽性細胞の数により規定されると考えられ、したがって PHA 反応性は、OKT 4 陽性細胞の比率にも反映される結果 OKT 4/OKT 8 比とも相関するものと理解される。同じく Reinherz ら²²⁾は、Con A や同種抗原には OKT 4 陽性細胞および OKT 8 陽性細胞の両細胞が反応すると述べており、このことから Con A 反応性や MLC 反応性と T-cell サブセットの

間に一定の傾向が認められないのではないかと推測される。今回の検討では、末梢血中に著明に増加している OKT 8 陽性細胞の免疫反応に及ぼす影響、すなわち suppressor cell として機能しているかどうかそれぞれ示唆するような一定の傾向はみられなかった。骨髓移植後 T-cell サブセットとその機能面との関係を検討した最近の Lum ら⁶⁾の報告では、in vitro 免疫グロブリン産生能低下と OKT 4/OKT 8 比低下との明らかな、有意の相関性を、また Schroff ら⁸⁾の報告では OKT 4/OKT 8 比があるレベルより低下すると cytomegalo virus 感染が生じやすいという成績を報告している。しかし、最近骨髓移植患者の末梢血 T-cell サブセットについて、そのサブセットの不均衡に加えさらに詳細な検討が成され、tenuus toxoid, Epstein-Barr virus, herpes simplex virus, PWM による多種の抗原刺激に反応する各リンパ球クローンにおける成熟度の差異が論議されるに至り²³⁾、既存のモノクローナル抗体より機能的 T-cell クローンの解析に適した新しいモノクローナル抗体の開発が望まれている。本研究の成績およびこれらの報告から得られる結論としては、骨髓移植後長期にわたり持続する免疫不全状態は auto-BMT より allo-BMT においてより高度であり、その原因としては機能的 T-cell サブセットさらには T-cell クローンにおける不均衡分布、あるいは分化成熟障害に因ることが示唆されるということである。

成 績

同種骨髓移植および自家骨髓移植後、無治療で長期生存中の患者末梢血 T-cell サブセットおよびその免疫反応性を検討し、以下の成績を得た。

1) 同種移植患者では、末梢血リンパ球、OKT 3 陽性細胞、OKT 8 陽性細胞および OKIa 1 陽性細胞の著明な増加を認め、そのために OKT 4/OKT 8 比は著明に減少し著しい逆転を認めた。その逆転は 5 年以上生存している例にも認められた。Con A, PHA および PWM に対する反応性では、自家移植患者に比べ有意な低反応を示したが、MLC 反応性は正常域に回復していた。

2) 自家移植患者では OKT 4 陽性細胞の有意の低下を認めるのみで、その他の表面抗原からの検討では全て正常範囲であった。そのため OKT 4/OKT 8 比の低下を来し逆転を認めたが、その程度は同種移植より軽度であった。Con A および PHA に対する反応性は有意の低下を認めたが、PWM および MLC 反応性は正常に回復していた。

3) PHA 反応性と OKT 4 陽性細胞数および

OKT 4/OKT 8 比とは有意の相関を認めたが、OKT 8 陽性細胞数との相関は認めなかった。

以上の成績から、骨髓移植患者では移植の種類に関係なく、T-cell 系の免疫学的再構築は移植後 1 年以上の長期にわたり不完全のままであり、それは T-cell サブセットの不均衡という特徴を持つ。さらにこれらの免疫学的回復の遅延は自家骨髓移植患者より、同種骨髓移植患者により顕著であった。すなわち、長期にわたり遷延する骨髓移植患者の高度の T-cell 系免疫不全状態は、T-cell サブセットの不均衡、T-cell の成熟障害、機能的分化異常などに因ることが示唆された。

文 献

- 1) Atkinson, K., Storb, R., Prentice, R. L., Weiden, P. L., Witherspoon, R. P., Sullivan, K., Noel, D. & Thomas, E. D.: Analysis of late infections in 89 long-term survivors of bone marrow transplantation. *Blood*, 53, 720-731 (1979).
- 2) Storb, R., Tsoi, M. S., Witherspoon, R. P., Sullivan, K., Lum, L., Deeg, H. J. & Atkinson, K.: Unique immunologic problems in human bone marrow transplant recipients. *Transplant. Proc.*, 13, 1624-1627 (1981).
- 3) Tsoi, M. S.: Immunological mechanisms of graft-versus-host disease in man. *Transplantation*, 33, 459-464 (1982).
- 4) De Bruin, H. G., Astaldi, A., Leupers, T., van de Griend, R. J., Dooren, L. J., Schellekens, P. T. A., Tanke, H. J., Roos, M. & Vossen, J. M.: T lymphocyte characteristics in bone marrow transplanted patients. II. Analysis with monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 127, 244-251 (1981).
- 5) Atkinson, K., Hansen, J. A., Storb, R., Goehle, S., Goldstein, G. & Thomas, E. D.: T-cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic-suppressor subsets. *Blood*, 59, 1292-1298 (1982).
- 6) Lum, L. G., Orcutt-Thordarson, N., Seignuret, M. C. & Storb, R.: The regulation of Ig synthesis after marrow transplantation. IV. T4 and T8 subset function in patients with chronic graft-vs-host disease. *J. Immunol.*, 129, 113-119 (1982).
- 7) Fox, R., McMillan, R., Spruce, W., Tani, P. & Mason, D.: Analysis of T lymphocytes after bone marrow transplantation using monoclonal antibodies. *Blood*, 60, 578-582 (1982).

- 8) **Schroff, R. W., Gale, R. P. & Fahey, J. L. :** Regeneration of T cell subpopulations after bone marrow transplantation: Cytomegalovirus infection and lymphoid subset imbalance. *J. Immunol.*, **129**, 1926-1930 (1982).
- 9) **Linch, D. C., Knott, L. J., Thomas, R. M., Harper, P., Goldstone, A. H., Davis, E. G & Levinski, R. J. :** T cell regeneration after allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Brit. J. Haematol.*, **53**, 451-458 (1938).
- 10) **Shiobara, S., Harada, M., Mori, T., Kodo, H., Ishino, C., Matsue, K., Odaka, K., Kondo, K., & Hattori, K.** Difference in posttransplant recovery of immune reactivity between allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Transplant. Proc.*, **14**, 429-433 (1982).
- 11) **Harada, M., Yoshida, T., Ishino, C., Matsue, K., Kodo, H., Mori, T., Shiobara, S., Odaka, K., Ohtake, S., Kondo, K., Nakao, S., Ueda, M., Hattori, K. & the Kanazawa University Bone Marrow Transplant. Team. :** Hematologic recovery following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Exp. Hematol.*, in press.
- 12) **Harada, M., Yoshida, T., Funada, H., Kodo, H., Mori, T., Ishino, C., Matsue, K., Shiobara, S., Ohtake, S., Odaka, K., Teshima, H., Kondo, K., Nakao, S., Ueda, M., Nakamura, S. & Hattori, K. :** Allogeneic bone marrow transplantation for the treatment of acute leukemia: The Kanazawa experience. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **12**, 301-314 (1982).
- 13) **Hattori, K., Harada, M., Yoshida, T., Ishino, C., Funada, H., Kodo, H., Mori, T., Matsue, K., Shiobara, S., Odaka, K., Ohtake, S., Teshima, H., Kondo, K., Yamamura, M., Nakao, S., Ueda, M. & Nakamura, S. :** A preliminary report on autologous bone marrow transplantation for the treatment of advanced non-Hodgkin's lymphoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **12**, 171-180 (1982).
- 14) **Harada, M., Ishino, C., Mori, T. & Hattori, K. :** Active rosette forming cells as a possible functional subpopulation of human peripheral T lymphocytes. *Jpn. J. Exp. Med.*, **47**, 489-494 (1977).
- 15) **Fass, L., Ochs, H. D., Thomas, E. D., Mickelson, E., Storb, R. & Fefer, A. :** Studies of immunological reactivity following syngeneic or allogeneic marrow grafts in man. *Transplantation*, **16**, 630-640 (1973).
- 16) **Fay, J. W., House, S. B., Bull, M. I., Herzig, G. P., Kirkpatrick, C. H., Stout, F. G. & Graw, R. G. :** Immunity following allogeneic, syngeneic, or autologous bone marrow transplantation in man. *Exp. Hematol.*, **4**, 179 (1976).
- 17) **Ringden, O., Witherspoon, R., Storb, R., Ekelund, E. & Thomas, E. D. :** B cell function in human marrow transplant recipients assessed by direct and indirect hemolysis in-gel assays. *J. Immunol.*, **123**, 2729-2734 (1979).
- 18) **Witherspoon, R. P., Lum, L. G., Storb, R. F. & Thomas, E. D. :** In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after human marrow transplantation. II. Deficient T and non-T lymphocyte function within 3-4 months of allogeneic, syngeneic, or autologous marrow grafting for hematologic malignancy. *Blood*, **59**, 844-850 (1982).
- 19) **Livnat, S., Seigneuret, M., Storb, R. & Prentice, R. S. :** Analysis of cytotoxic effector cell function in patients with leukemia or aplastic anemia before and after marrow transplantation. *J. Immunol.*, **124**, 481-490 (1980).
- 20) **Witherspoon, R. P., Kopecky, K., Storb, R. F., Flournoy, N., Sullivan, K. M., Sosa, R., Deeg, H. J., Ochs, H. D., Cheever, M. A., Fefer, A. & Thomas, E. D. :** Immunological recovery in 48 patients following syngeneic marrow transplantation for hematological malignancy. *Transplantation*, **33**, 143-149 (1982).
- 21) **Janossy, G., Tidman, N., Papageorgiou, E. S., Kung, P. C. & Goldstein, G. :** Distribution of T lymphocyte subsets in the human bone marrow and thymus: An analysis with monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, **126**, 1608-1613 (1981).
- 22) **Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F. :** Regulation of the immune response—Inducer and suppressor T-lymphocyte subsets in human beings. *N. Engl. J. Med.*, **303**, 370-373 (1980).
- 23) **Lum, L. G., Seigneuret, M. C., Orcutt-Thordarson, N., Froelich, T. L. & Storb, R. :** Functional diversity in OKT4 and OKT8 subsets from long-term survivors after HLA-identical marrow grafting. *J. Clin. Immunol.*, in press.

Studies on Immunological reconstitution after Bone Marrow transplantation [I] Recovery of T-cell subsets and immune Reactivities Mikio Ueda, Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Juzen Med. Soc., 93, 36–45 (1984)

Key words: Bone marrow transplantation, Mixed lymphocyte culture, Suppressor cell

Abstract

T-cell subsets and their immune reactivities were studied in long-term survivors after bone marrow transplantation, and the results were compared between autotransplant and allotransplant patients. These two groups of patients (4 autotransplants and 4 allotransplants) were roughly comparable in terms of their underlying diseases, pretransplant conditioning regimens, supportive care and posttransplant sampling days for immunological studies. Significant differences were observed in the total number of OKT3-, OKT4-, OKT8- and OKIa1-positive cells between autologous and allogeneic marrow recipients. Similar differences were observed in T-cell subsets between transplant patients and normal controls. Decreased OKT4 cells and increased OKT8 cells resulted in the inversion of OKT4/OKT8 ratio, which was significantly lower in allotransplant patients than in autotransplant ones. Proliferative responses to mitogens were also significantly depressed in allotransplant patients compared with autotransplant ones, although both groups of transplant patients showed more depressed responses than the normal controls. In contrast, there were no significant differences in mixed lymphocyte culture (MLC) reactivities among transplant patients and normal controls. When mitogenic responses were analyzed in relation to T-cell subsets, phytohemagglutinin (PHA) responsiveness showed a significant correlation with OKT4/OKT8 ratios ($P<0.01$) and with the numbers of cultured OKT4 cells ($P<0.01$). These observations suggest that T lymphocyte reconstitution is still incomplete or abnormal in long-term survivors regardless of the type of grafts and furthermore, that abnormalities observed in these long-term survivors are characterized by the imbalance of T-cell subsets and are more profound in allotransplant patients than in autotransplant ones.